

Docket No.: 1169-033

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of :
Otto DIDEBERG *et al.* : *Confirmation No.* -----
U.S. Patent Application No. *Unassigned as yet* : *Group Art Unit: Unassigned as yet*
Filed: *herewith* : *Examiner: Unassigned as yet*

For: STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE PBP2X MINI-PROTEIN AND USES THEREOF

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicant hereby claims the priority of *France PCT/IB03/03397 filed July 11, 2003*, and under 35 U.S.C. 119, Applicants hereby claim the priority of *France Patent Application No. 02/08724 filed July 11, 2002*.

Respectfully submitted,

LOWE HAUPTMAN & BERNER, LLP



William E. Beaumont
Registration No. 30,996

1700 Diagonal Road, Suite 310
Alexandria, Virginia 22314
(703) 684-1111 WEB/sj
Facsimile: (703) 518-5499
Date: January 10, 2005

BEST AVAILABLE COPY



8/03/3397

REC'D 10 SEP 2003

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 JUL. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 010801

| | | | |
|---|----------------------|---|--|
| REMISE DES PIÈCES DATE 11 JUIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0208724 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 11 JUIL. 2002 PAR L'INPI | | 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6 avenue de Messine 75008 PARIS | |
| Vos références pour ce dossier (facultatif) BLO/HLP/cp263/79FR | | | |
| Confirmation d'un dépôt par télécopie | | <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie | |
| 2 NATURE DE LA DEMANDE | | Cochez l'une des 4 cases suivantes | |
| Demande de brevet | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| Demande de certificat d'utilité | | <input type="checkbox"/> | |
| Demande divisionnaire | | <input type="checkbox"/> | |
| Demande de brevet initiale | | N° _____ Date _____ | |
| ou demande de certificat d'utilité initiale | | N° _____ Date _____ | |
| Transformation d'une demande de brevet européen | | <input type="checkbox"/> | |
| Demande de brevet initiale | | N° _____ Date _____ | |
| 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) MINI-PROTEINE PBP2x DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ET SES APPLICATIONS. | | | |
| 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE | | Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» | |
| 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) | | <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique | |
| Nom ou dénomination sociale | | COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE | |
| Prénoms | | | |
| Forme juridique | | Etablissement public | |
| N° SIREN | | _____ | |
| Code APE-NAF | | _____ | |
| Domicile ou siège | Rue | 31-33 rue de la Fédération | |
| | Code postal et ville | 75 015 PARIS | |
| | Pays | FRANCE | |
| Nationalité | | Française | |
| N° de téléphone (facultatif) | | N° de télécopie (facultatif) | |
| Adresse électronique (facultatif) | | | |
| <input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» | | | |

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES
DATE 11 JUIL 2002
LIEU 75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT 0208724
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 @ W / 010801

| | | |
|---|----------------------|--|
| Vos références pour ce dossier : (facultatif) | | BLO/HLP/cp263/79FR |
| 6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) | | |
| Nom | | ORES |
| Prénom | | Béatrice |
| Cabinet ou Société | | CABINET ORES |
| N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel | | |
| Adresse | Rue | 6 avenue de Messine |
| | Code postal et ville | 75 008 PARIS |
| | Pays | FRANCE |
| N° de téléphone (facultatif) | | 01.45.62.75.00. |
| N° de télécopie (facultatif) | | 01.45.62.04.86. |
| Adresse électronique (facultatif) | | ores@cabinet-ores.com |
| 7 INVENTEUR (S) | | |
| Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques | | |
| Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes | | <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s) |
| 8 RAPPORT DE RECHERCHE | | |
| Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) | | |
| Établissement immédiat ou établissement différé | | <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) | | Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non |
| 9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES | | Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes | | |
| 10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES (n° 92-4046) | | VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI C. MARTIN |

La présente invention est relative à une protéine recombinante modifiée dérivée de PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*, dénommée mini-PBP2x, ainsi qu'à ses applications pour la sélection et l'identification d'antibiotiques actifs sur les souches de *S. pneumoniae* résistantes aux β -lactamines.

5 La résistance aux antibiotiques représente un problème majeur en thérapie anti-infectieuse. Depuis plusieurs années, on observe l'apparition d'un nombre croissant de souches de bactéries très résistantes aux composés de la famille des β -lactamines (pénicillines et céphalosporines..), qui représentent les antibiotiques les plus utilisés dans le monde entier depuis plus de 60 ans ; actuellement, 21 % des
10 isolats cliniques *Streptococcus pneumoniae*, un des pathogènes majeurs des voies respiratoires supérieures sont très résistants aux β -lactamines (Concentration minimale inhibitrice (CMI) $> 2 \mu\text{g/ml}$; Doern et al., Antimicrob. Agents Chemother, 2001, 45, 1721-1729).

Les β -lactamines ont pour cible les PBPs (*Penicillin Binding*
15 *Proteins*), des protéines membranaires qui catalysent des étapes essentielles de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Chaque espèce de bactérie possède plusieurs PBPs, dont le poids moléculaire varie entre 30 kDa et 100 kDa.

Les PBPs de haut poids moléculaire comprennent un domaine cytoplasmique court, un seul domaine transmembranaire et un grand domaine péri-
20 plasmique et sont divisées en classe A (possédant à la fois l'activité transpeptidase et glycosyltransférase (pontage) et en classe B (possédant un domaine N-terminal de fonction inconnue et un domaine où se localise l'activité transpeptidase), qui sont facilement identifiables grâce à des motifs d'acides aminés conservés pour chaque classe de PBP.

25 Les PBPs de faible poids moléculaire possèdent essentiellement une activité carboxypeptidase. Des études biochimiques indiquent que seules les PBPs de haut poids moléculaire sont des enzymes multifonctionnelles essentielles à la survie des bactéries ; en revanche les PBPs de faible poids moléculaire ne sont pas essentielles et régulent uniquement le degré de pontage de la paroi bactérienne.

30 Le mode d'action des β -lactamines repose sur l'analogie de structure entre le cycle des β -lactamines et le D-alanyl-D-alanine de l'extrémité C-terminale des peptides du peptidoglycane ; les β -lactamines sont des pseudo-substrats

de la transpeptidase capables d'acyler le résidu sérine du site actif de cette transpeptidase, qui est ensuite déacylé très lentement, perturbant ainsi la synthèse du peptidoglycane.

- Les mécanismes de résistance aux β -lactamines chez les bactéries à Gram⁺ comprennent essentiellement : la production de β -lactamases qui hydrolysent le cycle des β -lactamines avant qu'elles n'atteignent leur cible (PBPs), l'altération de la perméabilité membranaire et la modification des PBPs.

- Streptococcus pneumoniae* a développé une résistance aux β -lactamines en modifiant ses PBPs ; la combinaison de mutations ponctuelles dans les gènes PBP et d'évènements de recombinaison homologue de ces gènes avec ceux des souches de streptocoques apparentées (*S. mitis*, *S. oralis*) résulte dans la production de PBPs possédant une faible affinité pour les β -lactamines.

- Parmi les PBPs de *S. pneumoniae*, la protéine PBP2x qui est essentielle pour la survie de *S. pneumoniae* et constitue le premier facteur de résistance aux β -lactamines (Hakenbeck et al., J. Bacteriol., 1998, 180, 1831-1840), représente la cible majeure pour l'identification de nouveaux antibiotiques actifs sur les souches de *S. pneumoniae*, résistantes aux β -lactamines.

- La PBP2x est une protéine de 750 acides aminés comprenant une région cytoplasmique (positions 1 à 18), une région transmembranaire (positions 19 à 48), un domaine ne liant pas les pénicillines (*non penicillin-binding domain* ou n-PB, positions 49-265), un domaine de liaison aux pénicillines/domaine transpeptidase (positions 266 à 615) et un domaine C-terminal (616-750).

- L'analyse structure-fonction de la PBP2x a permis de préciser les mécanismes moléculaires de la résistance de la PBP2x aux β -lactamines (Mouz et al., P.N.A.S., 1998, 95, 13403-13406 ; J. Biol. Chem., 1999, 274, 19175-19180).

- La structure tridimensionnelle de la PBP2x a été déterminée à partir d'une PBP2x comprenant une délétion des régions cytoplasmiques et transmembranaires, dénommée PBP2x* ; cette structure a été déterminée avec une résolution de respectivement 3,5, 2,4 et 3,2 Å, pour une souche de *S. pneumoniae* sensible aux β -lactamines (Souche R6 : Pares et al., Nature Struct. Biol., 1996, 3, 284-289 ; Gordon et al., J. Mol. Biol., 2000, 299, 477-485) et pour un isolat clinique résistant (Dessen et

al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 45106-45112 ; numéros d'accès dans la base de données PROTEIN DATA BANK (<http://www.rcsb.org/>), respectivement 1PMD, 1QME et 1K25).

La structure tridimensionnelle d'un complexe entre une PBP2x* d'une souche sensible (souche R6) et une β -lactamine (céfuroxime) a également été déterminée avec une résolution de 2,8 Å (numéro d'accès 1QMF dans la base de données PROTEIN DATA BANK et Gordon et al., J. Mol. Biol., 2000, 299, 477-485).

Toutefois, les données actuellement disponibles n'ont pas permis d'identifier de nouvelles molécules antibiotiques actives sur les souches de *S. pneumoniae* résistantes aux β -lactamines, notamment en raison de la difficulté d'obtenir des cristaux ayant un bon pouvoir diffractant (2,5 Å) pour la PBP2x native (type sauvage, sensible aux β -lactamines), les complexes PBP2x-inhibiteurs et les variants de PBP2x résistants aux β -lactamines.

En effet, l'analyse des cristaux de PBP2x qui diffractent à 2,4 Å (1QME, Gordon et al., J. Mol. Biol., 2000, 299, 477-485) a montré qu'ils contenaient une forme de PBP2x partiellement protéolysée au niveau de la liaison peptidique entre les résidus en position 182 et 183, obtenue dans des conditions expérimentales non-reproductibles, résultant de l'exposition de la protéine PBP2x à 25°C pendant plusieurs mois, lors du processus de cristallisation.

Les Inventeurs ont recherché, en choisissant comme modèle la PBP2x d'une souche de *S. pneumoniae*, sensible à la pénicilline (souche R6) dont la structure tridimensionnelle est connue, s'il était possible d'obtenir des PBP2x plus cristallisables de façon reproductible, et douées d'un meilleur pouvoir de diffraction.

Ils ont ainsi constaté que des délétions supplémentaires dans la région correspondant au domaine n-PB (positions 50 à 265 de PBP2x) qui ne modifient pas les propriétés enzymatiques de PBP2x (liaison aux β -lactamines et activité transpeptidase), permettaient d'obtenir facilement des cristaux ayant une meilleure qualité de diffraction.

L'approche envisagée est applicable à n'importe quelle PBP2x issue d'une souche de *S. pneumoniae* sensible ou résistante aux β -lactamines.

Cette mini-protéine représente un outil parfaitement adapté à la sélection et à l'identification de nouveaux antibiotiques, actifs sur les souches de *S. pneumoniae* résistantes aux β -lactamines.

En conséquence, la présente invention a pour objet une protéine
 5 dérivée d'une PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une concaténation des fragments correspondant respectivement aux acides aminés situés entre les positions 74 à 90, 186 à 199, 218 à 228 et 257-750, en référence à la séquence de la protéine PBP2x de la souche R6 (SWISSPROT P14677 ou GENBANK 18266817), chacun desdits fragments étant précédé d'un fragment
 10 peptidique de 1 à 7 acides aminés.

La protéine selon l'invention est dénommée ci-après mini-protéine PBP2x ou mini-PBP2x ; elle comprend donc la délétion des acides aminés situés respectivement entre les positions 1 à 73, 91 à 185, 200 à 217 et 229 à 256, telles que définies ci-dessus et l'insertion, en lieu et place desdites délétions, d'un fragment
 15 peptidique de 1 à 7 acides aminés.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite protéine mini-PBP2x, ledit fragment peptidique de 1 à 7 acides aminés comprend des acides aminés de la séquence de ladite protéine PBP2x de *Streptococcus pneumoniae* correspondant à ceux situés entre les positions -1 à -7, relativement aux résidus en position 74, 186,
 20 218 et 257 et/ou entre les positions +1 à +7, relativement aux résidus en position 90, 199 et 228 tels que définis ci-dessus.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine mini-PBP2x, ledit fragment peptidique de 1 à 7 acides aminés comprend des acides aminés dont le volume de la chaîne latérale est petit, comme l'alanine (A), la sérine
 25 (S), la glycine (G) ou la thréonine (T).

Au sens de la présente invention, ladite protéine PBP2x de *S. pneumoniae* est définie par les caractéristiques suivantes :

- elle est codée par le gène dénommé *pbpX* correspondant à celui situé dans le génome de la souche R6 de *S. pneumoniae*, entre les positions 2263 et
 30 4515 du locus présentant le numéro d'accèsion NCBI AE008411 ou GENBANK 15457852.

elle comprend les motifs en acides aminés suivants (code à une lettre), propres aux PBPs de classe B. :

M1: RGXhX(D/S)RSGXXXA

M2: (R/K)XXPXG

5 M3 : (G/Y)hEXXXDXXL

M4: hXX(S/T)hDXXXQ

M5: T(G/S)EhhXXXXSPXh(D/N)

M6: hEP(A/G)SXXK

M7: hXXSXNh

10 M8: K(T/S)G,

dans lesquels les acides aminés en gras sont strictement conservés dans les séquences de PBPs de classe B ; / représente une alternative, par exemple D/S représente un acide aspartique ou une sérine ; X représente n'importe quel acide aminé ; h représente un acide aminé hydrophobe et les autres lettres représentent les acides aminés le plus
15 fréquemment rencontrés à cette position, et

sa séquence présente sur sa totalité, au moins 30% d'identité, de préférence au moins 50 % d'identité ou au moins 85 % de similarité avec la séquence de la souche R6 (SWISSPROT P14677).

L'identité d'une séquence par rapport à une séquence de référence
20 s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques, lorsque les deux séquences sont alignées, de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % d'identité avec une séquence de référence est définie, dans la présente invention
25 comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations pour 100 acides aminés de la séquence de référence, tout en conservant les propriétés fonctionnelles de ladite protéine de référence. Au sens de la présente invention, le terme altération inclut les délétions, les substitutions ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

30 La similarité d'une séquence par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques ou qui diffèrent par des substitutions conservatives, lorsque les deux séquences sont

alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles. Au sens de la présente invention, on entend par substitution conservative, la substitution d'un acide aminé par un autre qui présente des propriétés chimiques similaires (taille, charge ou polarité), qui généralement ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de la protéine.

5 Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % de similarité avec une séquence de référence est définie, dans la présente invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations non-conservatives pour 100 acides aminés de la séquence de référence. Au sens de la présente invention, le terme altérations non-conservatives inclut les délétions, les substitutions non-conservatives ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

La présente invention englobe les mini-PBP2x dérivées d'une PBP2x de n'importe quelle souche de *S. pneumoniae*, sensible ou résistante aux β -lactamines, notamment d'isolats cliniques résistants aux β -lactamines. A titre d'exemple non-limitatif on peut citer la souche C 506 résistante aux β -lactamines qui est décrite dans l'article aux noms de Laible et al. (Mol. Microbiol., 1989, 3, 1337-1348).

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite protéine mini-PBP2x, elle est dérivée d'une souche de *Streptococcus pneumoniae* résistante aux β -lactamines.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine mini-PBP2x, elle est constituée par la concaténation des fragments, tels que définis ci-dessus, de la PBP2x de la souche R6 de *Streptococcus pneumoniae* sensible aux β -lactamines (SWISSPROT P14677) et elle présente la séquence SEQ ID NO:1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine mini-PBP2x, elle comprend une substitution d'au moins un résidu méthionine par un résidu sélénométhionine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine mini-PBP2x, elle est associée à un ligand, notamment sous forme d'un complexe mini-PBP2x/ligand.

Conformément à l'invention ledit ligand est constitué par une molécule organique, notamment une protéine telle qu'un anticorps, ou une molécule inorganique ; ledit ligand est notamment un substrat tel qu'un pseudo-substrat, capable de se lier à ladite protéine mini-PBP2x par l'intermédiaire de son site actif et d'inhiber
 5 l'activité de ladite mini-PBP2x.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine mini-PBP2x, elle est sous la forme d'un cristal.

Conformément à l'invention, ledit cristal est constitué par une mini-PBP2x sous forme libre ou associée à un ligand tel que défini ci-dessus.

10 Conformément à l'invention, les conditions de cristallisation de la mini-PBP2x sont déterminées par la technique de la goutte suspendue. Par exemple, des cristaux de mini-PBP2x sont obtenus dans les conditions suivantes : mini-PBP2x (12 mg/ml), Hepes sodique 100 mM, pH 7,5, 2 % V/V PEG 400, 2M sulfate d'ammonium, à la température de 8°C.

15 Les mini-PBP2x constituées de fragments de PBP2x de souches de *S. pneumoniae* résistantes aux β -lactamines sont utiles pour le criblage et l'identification de nouveaux antibiotiques ; les mini-PBP2x constituées de fragments de PBP2x de souches de *S. pneumoniae* sensibles, notamment la mini-PBP2x de séquence SEQ ID NO: 1 sont utiles comme contrôle, dans le criblage et l'identification
 20 d'antibiotiques.

La présente invention a également pour objet un peptide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment d'au moins 7 acides aminés de la protéine mini-PBP2x, telle que définie ci-dessus, lequel peptide inclut au moins un résidu choisi parmi ceux situés aux positions 74, 90, 186, 199, 218, 228, et 257, tels que définis ci-dessus ; un tel peptide est particulièrement utile pour la production d'anticorps
 25 reconnaissant spécifiquement la mini-PBP2x.

La présente invention a également pour objet des anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre un peptide tel que défini ci-dessus.

Conformément à l'invention, lesdits anticorps sont soit des anticorps
 30 monoclonaux, soit des anticorps polyclonaux.

Ces anticorps peuvent être obtenus par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, comprenant notamment l'immunisation d'un animal avec

une protéine ou un peptide conforme à l'invention, afin de lui faire produire des anticorps dirigés contre ladite protéine ou ledit peptide.

De tels anticorps sont utiles notamment pour immobiliser la mini-PBP2x sur un support solide ou bien pour la co-cristalliser sous forme de complexes anticorps-mini-PBP2x.

La présente invention a également pour objet une molécule d'acide nucléique isolée, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences codant pour une mini-PBP2x telle que définie ci-dessus et les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

L'invention a également pour objet des amorces destinées à amplifier spécifiquement les séquences codant pour une PBP2x, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par la paire de séquence SEQ ID NO: 2-3.

L'invention a également pour objet des sondes et des amorces, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'environ 10 à 30 nucléotides correspondant à celle située à la jonction des fragments peptidiques de 1 à 7 acides aminés et des fragments de la PBP2x ; ces sondes et ces amorces permettent de détecter/amplifier spécifiquement lesdites molécules d'acide nucléique codant une mini-PBP2x.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites sondes et desdites amorces, elles présentent une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 4 à 9.

Les molécules d'acide nucléique selon l'invention sont obtenues par des méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

Les séquences codant pour PBP2x peuvent être obtenues par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR ou bien par criblage de banques d'ADN génomique par hybridation avec une sonde homologue. Par exemple, elles sont amplifiées par PCR à l'aide d'une paire d'amorces appropriée comme la paire de séquences SEQ ID NO: 2-3.

Les molécules d'acides nucléiques dérivées, codant pour une mini-PBP2x, sont obtenues par les méthodes classiques, permettant d'introduire des muta-

tions dans une séquence d'acide nucléique, connues en elles-mêmes, suivant les protocoles standards précités. Par exemple, la séquence codant pour la mini-PBP2x peut-être obtenue par mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel et al., (P.N.A.S., 1985, 82, 488-492), en utilisant les amorces SEQ ID NO: 4 à 7, puis amplification
 5 PCR à l'aide des amorces SEQ ID NO: 8 et 9, telles que définies ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend un insert sélectionné dans le groupe constitué par les molécules d'acides nucléiques codant une mini-PBP2x et leurs fragments tels que définis ci-dessus.

10 De préférence, ledit vecteur recombinant est un vecteur d'expression dans lequel ladite molécule d'acide nucléique ou l'un de ses fragments sont placés sous le contrôle d'éléments régulateurs de la transcription et de la traduction appropriés. En outre, ledit vecteur peut comprendre séquences (étiquettes ou *tag*) fusionnées en phase avec l'extrémité 5' et/ou 3' dudit insert, utiles pour l'immobilisation, et/ou la détection
 15 et/ou la purification de la protéine exprimée à partir dudit vecteur.

De manière préférée, ledit vecteur d'expression est un vecteur procaryote.

Ces vecteurs sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues
 20 en elles-mêmes.

La présente invention a également pour objet des cellules transformées par un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdites cellules sont des cellules procaryotes.

25 Les vecteurs recombinants et les cellules transformées tels que définis ci-dessus, sont utiles notamment pour la production de la mini-PBP2x et des peptides dérivés, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une mini-PBP2x telle que définie ci-dessus pour le criblage et l'identification d'antibiotiques.

30 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit criblage est réalisé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

a₁) la mise en contact d'une mini-PBP2x telle que définie ci-dessus avec une substance à tester,

b₁) la détection par tout moyen approprié de la liaison de ladite molécule à tester avec la mini-PBP2x et/ou de l'inhibition de l'activité de ladite mini-PBP2x résultant de cette liaison, et

c₁) la sélection des substances actives capables de se lier à la mini-PBP2x et/ou d'inhiber l'activité de ladite mini-PBP2x, utilisables comme antibiotiques.

La liaison de ladite molécule à tester avec la mini-PBP2x peut être mesurée par des tests de liaison classiques permettant de détecter les molécules capables de se lier de façon covalente au niveau de la sérine active (S₃₃₇, en référence à la séquence de PBP2x de la souche R6), notamment à l'aide d'un ligand préalablement marqué avec un chromophore ou avec un fluorophore comme une céphalosporine couplée à un chromophore (nitrocefine) ou bien par mesure de la décroissance de la fluorescence intrinsèque de ladite mini-PBP2x, comme décrit dans l'article aux noms de Jamin et al., Biochem. J., 1993, 292, 735-741.

L'inhibition de l'activité enzymatique de la mini-PBP2x peut-être déterminée, soit par mesure de l'inhibition de l'hydrolyse des substrats thioesters, soit par mesure de l'efficacité d'acylation de la sérine active, par les techniques classiques comme décrit dans l'article aux noms de Zhao et al., J. Bacteriol., 1997, 179, 4901-4908.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite identification est réalisée par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

a₂) la préparation de cristaux à partir d'une mini-PBP2x telle que définie ci-dessus,

b₂) la détermination de la structure tridimensionnelle de ladite mini-PBP2x à partir du cristal obtenu en a₂), et

c₂) l'identification de substances actives capables de se lier à la mini-PBP2x et/ou d'inhiber l'activité de ladite mini-PBP2x, utilisables comme antibiotiques.

Conformément à l'invention :

- le cristal est préparé à partir d'une mini-PBP2x libre dérivée d'une PBP2x d'une souche de *S. pneumoniae*, sensible ou résistante aux β -lactamines, ou bien de complexes mini-PBP2x/ligand, par la technique de la goutte suspendue.

- la structure tridimensionnelle de la mini-PBP2x est déterminée par les techniques classiques connues en elles mêmes comme la résonance magnétique nucléaire et la diffraction aux rayons X.

- les inhibiteurs de PBP2x sont identifiés par modélisation de la structure de la mini-PBP2x libre ou des complexes mini-PBP2x-ligand.

Avantageusement :

- la mini-PBP2x selon l'étape a₂) est soumise à un traitement préalable comprenant une étape de dénaturation par la température ou par un agent chimique, en présence ou en l'absence de ligands, suivie d'une étape de renaturation dans des conditions appropriées,

- la mini-PBP2x selon l'étape a₁) ou a₂) est constituée par la concaténation des fragments, tels que définis ci-dessus, d'une PBP2x d'une souche de *S. pneumoniae* résistante aux β -lactamines, et

- la détection effectuée à l'étape b₁) ou la détermination et l'identification effectuées respectivement aux étapes b₂) et c₂) sont réalisées par comparaison avec une mini-PBP2x constituée par la concaténation des fragments, tels que définis ci-dessus, d'une PBP2x d'une souche de *S. pneumoniae* sensible aux β -lactamines.

L'invention a également pour objet une trousse pour la mise en œuvre des procédés tels que définis ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle inclut au moins une protéine, un peptide, un anticorps, un vecteur, une cellule, une sonde ou une amorce, tels que définis ci-dessus.

La mini-PBP2x selon l'invention qui peut-être produite en grande quantité sous une forme fonctionnelle soluble, et facilement cristallisable, et ce pour l'ensemble des PBP2x, présente les avantages suivants :

- elle est adaptée au criblage systématique de nouvelles molécules antibiotiques par des tests fonctionnels (criblage à haut débit),

- elle est adaptée à l'étude structure-fonction des variants de PBP2x résistants aux β -lactamines et à la conception rationnelle de nouvelles molécules antibiotiques (modélisation moléculaire ou *drug design*).

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la mini-PBP2x objet de la présente invention ainsi

qu'au Tableau I résumant les séquences de la Demande et au dessin annexé, dans lequel:

- la figure 1 illustre la séquence en acides aminés d'une mini-PBP2x (SEQ ID NO: 1), issue de la PBP2x de la souche R6 de *S. pneumoniae* sensible aux β -lactamines (SWISSPROT P14677) ; les acides aminés de PBP2x qui ont été délétés dans la mini-PBP-2x sont remplacés par un trait d'union et ceux des fragments peptidiques qui ont été insérés sont représentés en italique ; les motifs propres aux PBPs de classe B sont soulignés.

Tableau I : Liste des séquences

| Numéro d'identification | Séquence |
|-------------------------|---|
| SEQ ID NO: 1 | Mini-PBP2x dérivée de PBP2x de la souche R6 (SWISSPROT P14677) |
| SEQ ID NO: 2 | amorce 5'ICNter |
| SEQ ID NO: 3 | amorce 3'ICCter |
| SEQ ID NO: 4 | oligonucléotide mini 1 |
| SEQ ID NO: 5 | oligonucléotide mini 2 |
| SEQ ID NO: 6 | oligonucléotide mini 3 |
| SEQ ID NO: 7 | oligonucléotide mini 4 |
| SEQ ID NO: 8 | oligonucléotide mini2x <i>NdeI</i> |
| SEQ ID NO: 9 | oligonucléotide mini2x <i>XhoI</i> |

10

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1: PRODUCTION D'UNE MINI-PBP2x RECOMBINANTE

15 1) Construction d'un vecteur d'expression d'une mini-PBP2x

a) Matériels et méthodes

Un vecteur d'expression d'une mini-PBP2x a été construit à partir du plasmide pGEX-S-PBP2x*-f1 (Mouz et al., J. Biol. Chem., 1999, 274, 19175-19180) contenant la séquence codant pour la PBP2x* de la souche R6 de *S. pneumoniae* sensible aux β -lactamines (fragment 49-750 de la PBP2x de la séquence

20

en acides aminés GENBANK P14677, correspondant à la séquence nucléotidique GENBANK X16367).

Les délétions des acides aminés situées entre les positions 49 à 73, 94 à 183, 200 à 217 et 230 à 256 et l'insertion en lieu et place desdites délétions, respectivement des fragments de liaison Gly-Ser-Gly, Gly-Gly, Gly et Gly-Gly-Gly a été réalisée par mutagenèse dirigée, selon la méthode de Kunkel et al. (P.N.A.S., 1985, 82, 488-492), en utilisant les protocoles tels que décrits dans Mouz et al., J. Biol. Chem., 1999, 274, 19175-19180).

De manière plus précise, le phagemide dénommé pGEX-S-PBP2x*-f1 est transformé en simple brin puis utilisé comme matrice pour les étapes de mutagenèse (délétions et insertions). Les étapes de mutagenèse ont été réalisées en deux étapes, la première avec les oligonucléotides Mini 1 (SEQ ID NO: 4) et Mini 3 (SEQ ID NO: 6) et la deuxième avec les oligonucléotides Mini 2 (SEQ ID NO: 5) et Mini 4 (SEQ ID NO: 7):

- Mini 1 : 5'-CATAAATAGTCCCACGTTTGGCCCCGGATCCACGCGGAACCAG-3', cet oligonucléotide permet la délétion de la séquence nucléotidique correspondant aux acides aminés situés entre les positions 49 et 73 de PBP2x et l'insertion en lieu et place de ladite délétion d'un fragment de liaison correspondant à un peptide Gly-Ser-Gly.

- Mini 2: 5'-GTTTGGGTAACTACGATTGGGACCTCCAGAGGTTGCATCCTCAGCAATCGG-3', cet oligonucléotide permet la délétion de la séquence nucléotidique correspondant aux acides aminés situés entre les positions 94 et 183 de PBP2x et l'insertion en lieu et place de ladite délétion d'un fragment de liaison correspondant à un peptide Gly-Gly.

- Mini 3: 5'-GTTCAAGGAACTCTCCATTCCACCGCCGATAAACTAGAAGCAAATTG-3', cet oligonucléotide permet la délétion de la séquence nucléotidique correspondant aux acides aminés situés entre les positions 200 et 217 de PBP2x et l'insertion en lieu et place de ladite délétion d'un fragment de liaison correspondant à un peptide Gly.

- Mini 4: 5'-TGTATAAACATCCTTACCGTCCCCACCTCCCCCTGCAAGAATACTGTTC-3', cet oligonucléotide permet la délétion de la séquence nucléotidique correspondant aux acides aminés situés entre les positions 230 et 256 de PBP2x et l'insertion en lieu et place de ladite délétion d'un fragment de liaison correspondant à un peptide Gly-Gly-Gly.

Le plasmide ainsi obtenu, dénommé pGEX-S-mini-PBP2x-f1, a été utilisé comme matrice pour amplifier par PCR le fragment d'ADN correspondant à la mini-PBP2x et introduire à ses extrémités les sites de restriction *NdeI* et *Xho I*, pour le clonage dans le vecteur commercial pET30b (NOVAGEN). Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification PCR sont les suivants :

- oligo Mini2x *NdeI* (SEQ ID NO: 8) :

5'-CCGCATATGGCCAAACGTGGGACTATTTAT-3'

- oligo Mini2x *XhoI* (SEQ ID NO: 9) :

5'-GGCTCGAGTTAGTCTCCTAAAGTTAATGTAAT-3'

La séquence nucléotidique de la mini-PBP2x, dans le vecteur d'expression ainsi obtenu, dénommé pET30b-mini-PBP2x, a été confirmée par séquençage automatique.

b) Résultats

La séquence peptidique déduite de la séquence nucléotique obtenue par séquençage automatique présente la séquence SEQ ID NO: 1 (figure 1), correspondant à celle attendue pour une mini-PBP2x.

La mini-PBP2x est constituée par la succession des fragments correspondant respectivement aux acides aminés situés entre les positions 74 à 93, 184 à 199, 218 à 229 et 257-750 de la PBP2x (numéro d'accèsion SWISSPROT P14677), chaque fragment étant précédé respectivement du fragment de liaison GSG, GG, G et GGG.

2) **Production et purification de mini-PBP2x**

a) Matériels et méthodes

La mini-PBP2x est produite dans *E. coli*, à partir du vecteur d'expression tel que décrit à l'exemple 1.1, puis elle est purifiée par chromatographie, successivement sur colonne de Q-Sepharose, Resource Q et Superdex 200. Le produit obtenu est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et par spectrométrie de masse (*Electrospray ionization-mass spectrometry*, ESI-MS).

De manière plus précise, 2 litres de culture de la souche d'*E.coli* BL21 (DE 3) transformée par le plasmide pET30b-mini-PBP2x sont induits à une densité optique de 1 (600 nm), pendant 15 h à 16°C. Après centrifugation, le culot de bactéries est lavé par 500 ml de tampon A (Tris HCl, 20 mM, pH 8,0, 20 mM NaCl,

1 mM EDTA) contenant des inhibiteurs de protéases, puis il est resuspendu dans 50 ml du même tampon.

Après sonication (6 min sur un lit de glace/éthanol), les 50 ml de lysat bactérien sont centrifugés à 40000 g, à + 4°C, pendant 20 min, et le surnageant obtenu est déposé sur une colonne échangeuse d'ions de 20 ml (Q-Sépharose, AMERSHAM-PHARMACIA), préalablement équilibrée avec le tampon A. Un gradient linéaire de sodium est réalisé avec le tampon B (Tris HCl, 20 mM, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA). La protéine mini-PBP2x est éluée à partir de 38 % de Tampon B. Les fractions éluées sont analysées en Western blot, à l'aide d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la PBP2x*, puis elles sont regroupées. Le pool de fractions contenant la mini-PBP2x est dilué 10 fois dans du Tampon A sans NaCl puis déposé sur une colonne Resource Q de 6 ml (AMERSHAM-PHARMACIA) préalablement équilibrée avec le tampon A. Un gradient linéaire de sodium est réalisé avec le tampon. La protéine mini-PBP2x est éluée à partir de 55 % de tampon B. Les fractions correspondant au pic d'élution sont analysées en SDS-PAGE 15 %. Les fractions les plus pures sont regroupées et le pool obtenu est concentré jusqu'à un volume de 2 à 4 ml, puis déposé sur une colonne de chromatographie sur gel (Superdex 200, 16/60, AMERSHAM-PHARMACIA), préalablement équilibrée dans un tampon 10 mM Hepes, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA. La mini-PBP2x est éluee en un pic symétrique à un volume d'élution correspondant à une masse apparente de 60 kDa.

b) Résultats

La préparation de protéine mini-PBP2x ainsi obtenue présente un degré de pureté supérieur à 95 %. Le rendement final en protéine mini-PBP2x purifiée est de 10 à 15 mg/litre de culture, en fonction des préparations.

La purification par chromatographie sur gel montre la présence d'un pic d'élution symétrique qui atteste de l'homogénéité de la protéine en terme d'oligomérisation. Le volume d'élution correspond à une protéine monomérique.

La protéine mini-PBP2x présente une excellente solubilité car elle peut-être concentrée jusqu'à 15 mg/ml sans qu'elle ne précipite.

L'analyse en spectrométrie de masse montre la présence d'une protéine homogène, qui présente une masse moléculaire de 59465 Da correspondant à

celle calculée à partir de la séquence en acides aminés.

EXEMPLE 2: ANALYSE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES DE LA MINI-PBP2x

1) Matériels et méthodes

- 5 Les propriétés physico-chimiques et enzymatiques de la mini-PBP-2x purifiée obtenue à l'exemple 1, ont été mesurées de manière analogue à celles des variants de PBP2x, comme décrit dans Mouz et al. (P.N.A.S, 1998, 95, 13403-13406).

De manière plus précise :

10 a) Poids moléculaire

Le poids moléculaire a été déterminé par ESI-MS (*Electrospray ionization-mass spectrometry*).

b) Point isolélectrique

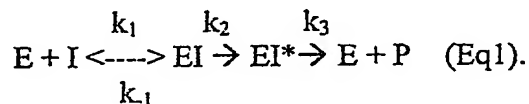
- 15 Le point isolélectrique théorique a été déterminé à partir de la composition en acides aminés de la mini-PBP2x.

c) Coefficient d'extinction

Le coefficient d'extinction molaire a été déterminé, expérimentalement par mesure de l'inhibition de la mini-PBP2x par la céfotaxime ou de façon théorique à partir de la séquence en acides aminés.

20 d) Cinétique d'acylation

- L'efficacité d'acylation de la mini-PBP2x par les β -lactamines, qui est définie par la valeur k_2/K où $K = k_{-1}/k_1$ selon l'équation 1 (Eq1), a été déterminée, en présence de céfotaxime (antibiotique de 3^{ème} génération) ; l'interaction des PBP (Enzyme E) avec les β -lactamines (I) est représentée par l'équation Eq1, dans laquelle
25 EI, EI* et P représentent respectivement, le complexe de Michaëlis-Menten, le complexe covalent acyl-enzyme et le produit (β -lactamine dégradée):



30 e) Cinétique d'hydrolyse

L'activité transpeptidase (activité d'hydrolyse) de la mini-PBP2x, définie par la valeur k_{cat}/K_m , a été déterminée en présence de deux analogues de

substrats de PBP2x [N-benzoyl-D-alanylmercaptoacetic thiolester (S2d) et carboxy-méthyl-benzoylaminothioacetate thiolester (S2a)], synthétisés selon le protocole décrit dans Adam et al. (Biochem. J., 1990, 270, 525-529).

2) Résultats

Les caractéristiques physico-chimiques de la mini-PBP2x sont présentées dans le Tableau II ci-dessous.

Tableau II : Paramètres physico-chimiques de la mini-PBP2x

| Paramètre | Mini-PBP2x |
|--|------------|
| Poids moléculaire (daltons) | 59465 ± 5 |
| Point isoélectrique théorique | 4,5 |
| Coefficient d'extinction à 280 nM (mole ⁻¹ cm ⁻¹ L ⁻¹) | 52830 ± 50 |

Les paramètres cinétiques de la mini-PBP2x sont présentés dans le Tableau III ci-dessous, par comparaison avec ceux de la PBP2x* (Jamin et al., Biochem.J., 1993, 292, 735-741; Mouz et al., P.N.A.S., 1998, 95, 13403-13406).

Tableau III : Paramètres cinétiques comparés de mini-PBP2x et de PBP2x*

| Paramètres ¹ | Mini-PBP2x | PBP2x* ² | PBP2x* ³ |
|-----------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|
| k ₂ /K (céfotaxime) | 146100 ± 9000 | 162000 ± 400 | 209000 ± 1800 |
| kcat/Km (S2a) | 76 ± 3 | 610 ± 150 | 139 ± 8 |
| kcat/Km (S2d) | 2890 ± 400 | 5000 ± 1400 | 2500 ± 200 |

¹ exprimés en M⁻¹.s⁻¹, ²Jamin et al., Biochem.J., 1993, 292, 735-741, ³Mouz et al., P.N.A.S., 1998, 95, 13403-13406

L'analyse des paramètres cinétiques des variants de PBP2x montre que, par comparaison à la PBP2x* qui est déletée uniquement des domaines cytoplasmiques et transmembranaires de PBP2x (résidus 1 à 48), la mini-PBP2x qui présente des délétions supplémentaires dans le domaine n-PB (*non penicillin-binding domain*), possède des propriétés enzymatiques (liaison aux β-lactamines et activité transpeptidase) équivalentes à celles de la PBP2x*.

EXEMPLE 3: CRISTALLISATION D'UNE MINI-PBP-2x

1) Matériels et méthodes

La mini-PBP2x est purifiée comme décrit à l'exemple 1. Les conditions de cristallisation de la mini-PBP-2x, obtenues par la méthode de la goutte

suspendue sont les suivantes : mini-PBP2x (12 mg/ml), Hepes sodique 100 mM, pH 7,5, 2 % V/V PEG 400, 2M sulfate d'ammonium, à la température de 8°C.

2) Résultats

- Les cristaux apparaissent après quelques semaines ; ils présentent une forme de bi-pyramide hexagonale avec un longueur de l'ordre de 150 μm .

EXEMPLE 4 : ANALYSE DES PROPRIETES DE DIFFRACTION D'UNE MINI-PBP2x

1) Matériels et méthodes

- Les données de diffraction ont été enregistrées à l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*, Grenoble , France). De manière plus précise, les cristaux ont été plongés dans le tampon de cristallisation tel que décrit à l'exemple 3, additionné d'éthylène-glycol (10 % V/V) avant d'être refroidis rapidement dans l'azote liquide. Les données de diffraction ont été enregistrées sur la ligne de lumière ID14-EH2 et traitées à l'aide des programmes MOSFLM et SCALA, de la suite CCP4 (Acta Crystallograph. Sect. D, 1994, 54, 905-921).

2) Résultats

- Les cristaux qui diffractent jusqu'à 2,5 Å, présentent une maille élémentaire hexagonale ($a=b=136,4$ Å, $c=142,8$ Å) et appartiennent au groupe d'espace $P6_1/P6_5$, avec deux molécules dans l'unité asymétrique. Les résultats d'un jeu complet de diffraction collecté à l'ESRF sont présentés dans le Tableau IV ci-dessous, par comparaison avec les données précédemment obtenues avec la PBP2x* soluble (Dessen et al., J. Biol. Chem., 2001, 48, 45106-45112; Gordon et al., J. Mol. Biol., 2000, 299, 477-485).

**Tableau IV : Données cristallographiques comparées de
Mini-PBP2x et de PBP2x***

| Données cristallographiques | Mini-PBP2x | PBP2x* (Dessen et al.) | PBP2x* (Gordon et al.) |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Dimensions (Å) | a = b = 136,4, c = 142,8 | a = b = 146,56, c = 132,61 | a = b = 129,9 c = 139,86 |
| Groupe d'espace | P6 ₁ /P6 ₅ | P3 ₂ | P4 ₁ 2 ₁ 2 |
| Résolution minimale (Å) | 2,5 | 3,2 | 2,4 |
| nbre de réflexions uniques | 51815 | 52413 | 42234 |
| Rsym (%) | 10 (29,6)* | 11,1 (36,7)* | 6,3 (36,8)* |
| I/σ | 2,3 | 10,2 (3,1)* | |
| Redondance | 4,0 | 3,2 | 7 |
| Complétion (%) | 99,9 | 96,1 (97,8) * | 99,7 (93,5) * |

* valeur correspondante dans la dernière couche de diffraction.

Le Tableau IV montre que les données de diffraction de mini-PBP2x se réduisent à 51815 réflexions uniques avec un Rsym de 10 % (30 % dans la dernière couche de diffraction : 2,64 à 2,5 Å), avec un degré de complétion de 99,9 %.

Une analyse plus fine des données obtenues avec la mini-PBP2x, en fonction de la résolution, est présentée dans le tableau V ci-dessous ; les données les plus significatives sont indiquées en gras.

Tableau V : Analyse statistique des données de diffraction de la mini-PBP2x en fonction de la résolution

| Dmin ¹ | Rfac ² | Rfull ³ | Rcum ⁴ | Av-I ⁵ | σ ⁶ | I/σ | Nmea ⁷ | Nref ⁸ |
|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------------|-----|-------------------|-------------------|
| 7,91 | 0,069 | 0,070 | 0,069 | 39616 | 5195,0 | 7,6 | 4938 | 1556 |
| 5,59 | 0,085 | 0,080 | 0,077 | 18912 | 2986,4 | 6,3 | 10812 | 3027 |
| 4,56 | 0,092 | 0,075 | 0,085 | 26060 | 4275,6 | 6,1 | 14633 | 3889 |
| 3,95 | 0,087 | 0,056 | 0,086 | 26842 | 4120,7 | 6,5 | 18118 | 4617 |
| 3,54 | 0,084 | 0,063 | 0,085 | 16584 | 2210,7 | 7,5 | 20977 | 5210 |
| 3,23 | 0,094 | 0,067 | 0,086 | 9999 | 1434,4 | 7,0 | 23488 | 5776 |
| 2,99 | 0,125 | 0,105 | 0,089 | 5454 | 996,0 | 5,5 | 25470 | 6242 |
| 2,80 | 0,165 | 0,136 | 0,092 | 3227 | 771,4 | 4,2 | 27395 | 6710 |
| 2,64 | 0,223 | 0,179 | 0,096 | 2006 | 648,9 | 3,1 | 29137 | 7145 |
| 2,5 | 0,296 | 0,220 | 0,100 | 1378 | 594,1 | 2,3 | 30891 | 7580 |

1 : résolution minimale (Å), 2 : facteur de confiance dans la tranche, 3 : facteur de confiance pour les réflexions complètes sur un film, 4 : facteur de confiance cumulé, 5 : moyenne des intensités <I>, 6 : écart type des intensités, 7 : nombre de réflexions mesurées, 8 : nombre de réflexions uniques dans la tranche de résolution.

Les données présentées dans les Tableaux IV et V ci-dessus montrent que la mini-PBP2x permet d'obtenir des cristaux ayant un bon pouvoir diffractant (2,5 Å).

EXEMPLE 5 : CRIBLAGE DE MOLECULES ANTIBIOTIQUES A L'AIDE D'UNE MINI-PBP2X

Le criblage d'inhibiteurs d'une mini-PBP2x, utilisables comme antibiotiques, est réalisée par des tests de liaison ou par des tests d'inhibition de l'activité enzymatique (activité d'hydrolyse) de la mini-PBP2x, en présence de la molécule à tester.

1) Test de liaison à la mini-PBP2x

Il a été montré que la fluorescence intrinsèque de la PBP2x décroît lors de la liaison, au niveau du site actif, d'inhibiteurs tels que les β -lactamines (Jamin *et al.*, *Biochem. J.* 292, 735-741). En conséquence, des inhibiteurs de la mini-PBP2x utilisables comme antibiotiques, sont criblés de manière analogue.

De manière plus précise, la mini-PBP2x, préparée comme décrit à l'exemple 1, est répartie dans les puits d'une plaque (2 à 500 μ l de mini-PBP2x dans du tampon 10 mM phosphate, pH 7), puis les molécules à tester sont ajoutées et les plaques sont incubées à une température comprise entre 5°C et 40°C, pendant une durée comprise entre 30 s et 1 h. La variation de fluorescence de la mini-PBP2x, en présence ou en l'absence de molécule à tester, est mesurée dans une fenêtre de longueur d'onde comprise entre 305 et 360 nm, après excitation à une longueur d'onde de 280 nm ; ladite mesure est effectuée soit en continu, soit après différents temps d'incubation compris entre 30 s et 1h. Les molécules capables de se lier au niveau du site actif de la mini-PBP2x, correspondant à celles pour lesquelles on observe une diminution de la fluorescence intrinsèque de la mini-PBP2x, sont sélectionnées.

2) Test d'inhibition de l'activité enzymatique de la mini-PBP2x

L'hydrolyse de pseudo-substrats de type thioester [N-benzoyl-D-alanylmercaptoacetic thiolester (S2d) et carboxyméthyl-benzoylaminothioacetate thiolester (S2a)] est mesurée avec la mini-PBP2x, seule ou en présence de molécule à tester, en suivant les protocoles tels que décrits dans Zhao *et al.*, précité. Les

molécules capables d'inhiber l'activité d'hydrolyse de la mini-PBP2x sont sélectionnées.

REVENDEICATIONS

1°) Protéine dérivée d'une PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une concaténation des fragments correspondant respectivement aux acides aminés situés entre les positions 74 à 90, 186
5 à 199, 218 à 228 et 257-750, en référence à la séquence de la protéine PBP2x de la souche R6 (SWISSPROT P14677 ou GENBANK 18266817), chacun desdits fragments étant précédé d'un fragment peptidique de 1 à 7 acides aminés.

2°) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit fragment peptidique comprend des acides aminés de ladite protéine PBP2x de
10 *Streptococcus pneumoniae* situés entre les positions -1 à -7, relativement aux résidus en position 74, 186, 218 et 257 et/ou entre les positions +1 à +7, relativement aux résidus en position 90, 199 et 228, tels que définis à la revendication 1.

3°) Protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ledit fragment peptidique comprend des acides aminés choisis parmi
15 l'alanine (A), la sérine (S), la glycine (G) et la thréonine (T).

4°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est dérivée d'une souche de *S. pneumoniae* résistante aux β -lactamines.

5°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO: 1.
20

6°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle comprend une substitution d'au moins un résidu méthionine par un résidu sélénométhionine.

7°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est associée à un ligand.
25

8°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est sous la forme d'un cristal.

9°) Peptide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment d'au moins 7 acides aminés de la protéine mini-PBP2x, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, lequel peptide inclut au moins un résidu choisi parmi ceux situés aux
30 positions 74, 90, 186, 199, 218, 228, et 257 tels que définis à la revendication 1.

REVENDICATIONS

1°) Protéine dérivée d'une PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une concaténation des fragments correspondant respectivement aux acides aminés situés entre les positions 74 à 90, 186
5 à 199, 218 à 228 et 257-750, en référence à la séquence de la protéine PBP2x de la souche R6 (SWISSPROT P14677 ou GENBANK 18266817), chacun desdits fragments étant précédé d'un fragment peptidique de 1 à 7 acides aminés.

2°) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit fragment peptidique comprend des acides aminés de ladite protéine PBP2x de
10 *Streptococcus pneumoniae* situés entre les positions -1 à -7, relativement aux résidus en position 74, 186, 218 et 257 et/ou entre les positions +1 à +7, relativement aux résidus en position 90, 199 et 228, tels que définis à la revendication 1.

3°) Protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ledit fragment peptidique comprend des acides aminés choisis parmi
15 l'alanine (A), la sérine (S), la glycine (G) et la thréonine (T).

4°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est dérivée d'une souche de *S. pneumoniae* résistante aux β -lactamines.

5°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO: 1.
20

6°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle comprend une substitution d'au moins un résidu méthionine par un résidu sélénométhionine.

7°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est associée à un ligand.
25

8°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est sous la forme d'un cristal.

9°) Peptide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment d'au moins 7 acides aminés de la protéine mini-PBP2x, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, lequel peptide inclut au moins un résidu choisi parmi ceux situés aux
30 positions 74, 90, 186, 199, 218, 228, et 257 tels que définis à la revendication 1.

10°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre un peptide selon la revendication 8.

11°) Molécule d'acide nucléique isolée, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences codant pour une mini-PBP2x selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

12°) Paire d'amorces, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO: 2-3.

13°) Sondes et amorces, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'environ 10 à 30 nucléotides correspondant à celle située à la jonction des fragments peptidiques de 1 à 7 acides aminés et des fragments de la PBP2x tels que définis à la revendication 1.

14°) Amorces selon la revendication 13, caractérisées en ce qu'elles présentent une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 4 à 9.

15°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend un insert sélectionné dans le groupe constitué par les molécules d'acides nucléiques codant une mini-PBP2x selon la revendication 12.

16°) Vecteur d'expression selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est constitué par un vecteur procaryote.

17°) Cellules transformées par un vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 15 ou 16.

18°) Cellules selon la revendication 17, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules procaryotes.

19°) Utilisation d'une mini-PBP2x selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour le criblage d'antibiotiques.

20°) Procédé de criblage d'antibiotiques, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

a₁) la mise en contact d'une mini-PBP2x selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 avec une substance à tester,

10°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre un peptide selon la revendication 9.

11°) Molécule d'acide nucléique isolée, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences codant pour une mini-PBP2x selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

12°) Paire d'amorces, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO: 2-3.

13°) Sondes et amorces, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'environ 10 à 30 nucléotides correspondant à celle située à la jonction des fragments peptidiques de 1 à 7 acides aminés et des fragments de la PBP2x tels que définis à la revendication 1.

14°) Amorces selon la revendication 13, caractérisées en ce qu'elles présentent une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 4 à 9.

15°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend un insert sélectionné dans le groupe constitué par les molécules d'acides nucléiques codant une mini-PBP2x selon la revendication 11.

16°) Vecteur d'expression selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est constitué par un vecteur procaryote.

17°) Cellules transformées par un vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 15 ou 16.

18°) Cellules selon la revendication 17, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules procaryotes.

19°) Utilisation d'une mini-PBP2x selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour le criblage d'antibiotiques.

20°) Procédé de criblage d'antibiotiques, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

a₁) la mise en contact d'une mini-PBP2x selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 avec une substance à tester,

b₁) la détection par tout moyen approprié de la liaison de ladite molécule à tester avec la mini-PBP2x et/ou de l'inhibition de l'activité de ladite mini-PBP2x résultant de cette liaison, et

5 c₁) la sélection et l'identification des substances actives capables de se lier à la mini-PBP2x et/ou d'inhiber l'activité de ladite mini-PBP2x, utilisables comme antibiotiques.

21°) Procédé d'identification d'antibiotiques, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

10 a₂) la préparation de cristaux à partir d'une mini-PBP2x selon l'une quelconque des revendications 1 à 7,

b₂) la détermination de la structure tridimensionnelle de ladite mini-PBP2x à partir du cristal obtenu en a₂), et

c₂) l'identification de substances actives capables de se lier à la mini-PBP2x et/ou d'inhiber l'activité de ladite mini-PBP2x, utilisables comme antibiotiques.

15 22°) Trousse de criblage pour la mise en œuvre du procédé selon la revendication 20 ou la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle inclut au moins une protéine, un peptide, un anticorps, un vecteur, une cellule, une sonde ou une amorce, selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

b₁) la détection par tout moyen approprié de la liaison de ladite molécule à tester avec la mini-PBP2x et/ou de l'inhibition de l'activité de ladite mini-PBP2x résultant de cette liaison, et

c₁) la sélection et l'identification des substances actives capables de
5 se lier à la mini-PBP2x et/ou d'inhiber l'activité de ladite mini-PBP2x, utilisables comme antibiotiques.

21°) Procédé d'identification d'antibiotiques, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

a₂) la préparation de cristaux à partir d'une mini-PBP2x selon l'une
10 quelconque des revendications 1 à 7,

b₂) la détermination de la structure tridimensionnelle de ladite mini-PBP2x à partir du cristal obtenu en a₂), et

c₂) l'identification de substances actives capables de se lier à la mini-PBP2x et/ou d'inhiber l'activité de ladite mini-PBP2x, utilisables comme antibiotiques.

15 22°) Trousse de criblage pour la mise en œuvre du procédé selon la revendication 20 ou la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle inclut au moins une protéine, un peptide, un anticorps, un vecteur, une cellule, une sonde ou une amorce, selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

| | | | |
|---------|-----|----------------------------------|-----|
| PBP2x | 1 | MKWTKRVIRYATKNRKSPAENRRRVGKSLS | 30 |
| MINI-2x | 1 | ----- | 0 |
| PBP2x | 31 | LLSVFVFAIFLVNFAVIIGTGTRFGTDLAK | 60 |
| MINI-2x | 1 | ----- | 0 |
| PBP2x | 61 | EAKKVHQTTTRTVPAKRGTIYDRNGVPIAED | 90 |
| MINI-2x | 1 | -----GSGAKRGIIYDRNGVPIAED | 20 |
| PBP2x | 91 | ATSYNVYAVIDENYKSATGKILYVEKTQFN | 120 |
| MINI-2x | 21 | ATSGG----- | 25 |
| PBP2x | 121 | KVAEVFHKYLDMEESYVREQLSQPNLKQVS | 150 |
| MINI-2x | 26 | ----- | 25 |
| PBP2x | 151 | FGAKGNGITYANMMSIKKELEAAEVKGIDF | 180 |
| MINI-2x | 26 | ----- | 25 |
| PBP2x | 181 | TTSPNRSYPNGQFASSFIGLAQLHENEDGS | 210 |
| MINI-2x | 26 | ---PNRSYPNGQFASSFIGG----- | 42 |
| PBP2x | 211 | KSL LGTSGMESSLNSILAGTDGIIITYEKDR | 240 |
| MINI-2x | 43 | -----GMESSLNSILAGGGG----- | 57 |
| PBP2x | 241 | LGNIVPGTEQVSQRTMDGKDVYTTISSPLQ | 270 |
| MINI-2x | 58 | -----DGKDVYIIISSPLQ | 71 |
| PBP2x | 271 | SFMETQMDAFQEKVKGYMTATLVSAKTGE | 300 |
| MINI-2x | 72 | SFMETQMDAFQEKVKGYMTATLVSAKIGE | 101 |
| PBP2x | 301 | ILATTQRPTFDADTKEGITEDFVWRDILYQ | 330 |
| MINI-2x | 102 | ILATTQRPTFDADTKEGITEDFVWRDILYQ | 131 |
| PBP2x | 331 | SNYEPGSTMKVMMLAAAIDNNTFPGGGEVFN | 360 |
| MINI-2x | 132 | SNYEPGSTIMKVMMLAAAIDNNTFPGGGEVFN | 161 |
| PBP2x | 361 | SSELK IADATIRDWVDVNEGLTGGRMMTFSQ | 390 |
| MINI-2x | 162 | SSELK IADATIRDWVDVNEGLTGGRMMTFSQ | 191 |
| PBP2x | 391 | GFAHSSNVGMTLLEQKMGDATWLDYLNRFK | 420 |
| MINI-2x | 192 | GFAHSSNVGMTLLEQKMGDATWLDYLNRFK | 221 |

FIGURE 1

| | | | |
|---------|-----|-----------------------------------|-----|
| PBP2x | 421 | FGVPTRFGLTDEYAGQLPADNIVNIAQSSF | 450 |
| MINI-2x | 222 | FGVPTRFGLTDEYAGQLPADNIVNIAQSSF | 251 |
| PBP2x | 451 | GQGISVTQTQMIRAF TA IANDGVMLEPKFI | 480 |
| MINI-2x | 252 | GQGISVTQTQMIRAF TA IANDGVMLEPKFI | 281 |
| PBP2x | 481 | SAIYDPNDQTARKSQKEIVGNPVSKDAASL | 510 |
| MINI-2x | 282 | SAIYDPNDQTARKSQKEIVGNPVSKDAASL | 311 |
| PBP2x | 511 | TRTNMVLVGTD P VYGTMYNHSTGKPTVTVP | 540 |
| MINI-2x | 312 | TRTNMVLVGTD P VYGTMYNHSTGKPTVTVP | 341 |
| PBP2x | 541 | GQNVALKSGTAQIADEKNGGYLVGLTDYIF | 570 |
| MINI-2x | 342 | GQNVALKSGTAQIADEKNGGYLVGLTDYIF | 371 |
| PBP2x | 571 | SAVSMSPAENPDFILYVTVQQPEHYSGIQL | 600 |
| MINI-2x | 372 | SAVSMSPAENPDFILYVTVQQPEHYSGIQL | 401 |
| PBP2x | 601 | GEFANPILERASAMKDSLNLQTTAKALEQV | 630 |
| MINI-2x | 402 | GEFANPILERASAMKDSLNLQTTAKALEQV | 431 |
| PBP2x | 631 | SQQSPYPMP SVKDISP GD LAEELRRNLVQP | 660 |
| MINI-2x | 432 | SQQSPYPMP SVKDISP GD LAEELRRNLVQP | 461 |
| PBP2x | 661 | IVVGTGTKIKNSSAEEGKNLAPNQQLILS | 690 |
| MINI-2x | 462 | IVVGTGTKIKNSSAEEGKNLAPNQQLILS | 491 |
| PBP2x | 691 | DKAEEVPDMYGWTKETAETLAKWLNIELEF | 720 |
| MINI-2x | 492 | DKAEEVPDMYGWTKETAETLAKWLNIELEF | 521 |
| PBP2x | 721 | QGSGSTVQKQDVRANTA IKDIKKITLTLGD | 750 |
| MINI-2x | 522 | QGSGSTVQKQDVRANTA IKDIKKITLTLGD | 551 |
| PBP2x | 750 | | 750 |
| MINI-2x | 551 | | 551 |

FIGURE 1 (suite)

LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE-CEA

<120> Mini-Protéine PBP2x de Streptococcus pneumoniae et ses applications

<130> F263FR79s

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 551

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

Gly Ser Gly Ala Lys Arg Gly Thr Ile Tyr Asp Arg Asn Gly Val Pro
1 5 10 15

Ile Ala Glu Asp Ala Thr Ser Gly Gly Pro Asn Arg Ser Tyr Pro Asn
20 25 30

Gly Gln Phe Ala Ser Ser Phe Ile Gly Gly Gly Met Glu Ser Ser Leu
35 40 45

Asn Ser Ile Leu Ala Gly Gly Gly Gly Asp Gly Lys Asp Val Tyr Thr
50 55 60

Thr Ile Ser Ser Pro Leu Gln Ser Phe Met Glu Thr Gln Met Asp Ala
65 70 75 80

Phe Gln Glu Lys Val Lys Gly Lys Tyr Met Thr Ala Thr Leu Val Ser
85 90 95

Ala Lys Thr Gly Glu Ile Leu Ala Thr Thr Gln Arg Pro Thr Phe Asp
100 105 110

Ala Asp Thr Lys Glu Gly Ile Thr Glu Asp Phe Val Trp Arg Asp Ile
115 120 125

Leu Tyr Gln Ser Asn Tyr Glu Pro Gly Ser Thr Met Lys Val Met Met
130 135 140

Leu Ala Ala Ala Ile Asp Asn Asn Thr Phe Pro Gly Gly Glu Val Phe
145 150 155 160

Asn Ser Ser Glu Leu Lys Ile Ala Asp Ala Thr Ile Arg Asp Trp Asp
165 170 175

Val Asn Glu Gly Leu Thr Gly Gly Arg Thr Met Thr Phe Ser Gln Gly
180 185 190

Phe Ala His Ser Ser Asn Val Gly Met Thr Leu Leu Glu Gln Lys Met
195 200 205

Gly Asp Ala Thr Trp Leu Asp Tyr Leu Asn Arg Phe Lys Phe Gly Val
 210 215 220
 Pro Thr Arg Phe Gly Leu Thr Asp Glu Tyr Ala Gly Gln Leu Pro Ala
 225 230 235 240
 Asp Asn Ile Val Asn Ile Ala Gln Ser Ser Phe Gly Gln Gly Ile Ser
 245 250 255
 Val Thr Gln Thr Gln Met Ile Arg Ala Phe Thr Ala Ile Ala Asn Asp
 260 265 270
 Gly Val Met Leu Glu Pro Lys Phe Ile Ser Ala Ile Tyr Asp Pro Asn
 275 280 285
 Asp Gln Thr Ala Arg Lys Ser Gln Lys Glu Ile Val Gly Asn Pro Val
 290 295 300
 Ser Lys Asp Ala Ala Ser Leu Thr Arg Thr Asn Met Val Leu Val Gly
 305 310 315 320
 Thr Asp Pro Val Tyr Gly Thr Met Tyr Asn His Ser Thr Gly Lys Pro
 325 330 335
 Thr Val Thr Val Pro Gly Gln Asn Val Ala Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 340 345 350
 Gln Ile Ala Asp Glu Lys Asn Gly Gly Tyr Leu Val Gly Leu Thr Asp
 355 360 365
 Tyr Ile Phe Ser Ala Val Ser Met Ser Pro Ala Glu Asn Pro Asp Phe
 370 375 380
 Ile Leu Tyr Val Thr Val Gln Gln Pro Glu His Tyr Ser Gly Ile Gln
 385 390 395 400
 Leu Gly Glu Phe Ala Asn Pro Ile Leu Glu Arg Ala Ser Ala Met Lys
 405 410 415
 Asp Ser Leu Asn Leu Gln Thr Thr Ala Lys Ala Leu Glu Gln Val Ser
 420 425 430
 Gln Gln Ser Pro Tyr Pro Met Pro Ser Val Lys Asp Ile Ser Pro Gly
 435 440 445
 Asp Leu Ala Glu Glu Leu Arg Arg Asn Leu Val Gln Pro Ile Val Val
 450 455 460
 Gly Thr Gly Thr Lys Ile Lys Asn Ser Ser Ala Glu Glu Gly Lys Asn
 465 470 475 480
 Leu Ala Pro Asn Gln Gln Val Leu Ile Leu Ser Asp Lys Ala Glu Glu
 485 490 495
 Val Pro Asp Met Tyr Gly Trp Thr Lys Glu Thr Ala Glu Thr Leu Ala
 500 505 510
 Lys Trp Leu Asn Ile Glu Leu Glu Phe Gln Gly Ser Gly Ser Thr Val
 515 520 525
 Gln Lys Gln Asp Val Arg Ala Asn Thr Ala Ile Lys Asp Ile Lys Lys

530

535

540

Ile Thr Leu Thr Leu Gly Asp
545 550

<210> 2
<211> 46
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 2
gtcgacttag tctcctaaag ttaatttaat ttttttaatg tttttg 46

<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 3
ggatccggga caggcactcg c 21

<210> 4
<211> 43
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4
cataaatagt cccacgtttg gccccggatc cacgcggaac cag 43

<210> 5
<211> 51
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5
gtttgggtaa ctacgattgg gacctccaga ggttgcattc tcagcaatcg g 51

<210> 6
<211> 48
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 6

gttcaaggaa ctctccattc caccgccgat aaaactagaa gcaaattg

48

<210> 7

<211> 49

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 7

tgtataaaca tccttaccgt cccacctcc ccctgcaaga atactgttc

49

<210> 8

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 8

ccgcatatgg ccaaacgtgg gactatttat

30

<210> 9

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 9

ggctcgagtt agtctcctaa agttaatgta at

32

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.